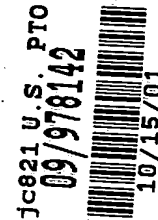


日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

SAH
#3
1-9-02



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2000年10月16日

出願番号
Application Number:

特願2000-314756

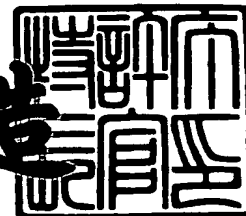
出願人
Applicant(s):

富士写真フイルム株式会社

2001年 9月20日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3086969

【書類名】 特許願

【整理番号】 60124

【提出日】 平成12年10月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水三丁目 1 1 番 4 6 号
富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 川崎 和也

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水三丁目 1 1 番 4 6 号
富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 天野 芳和

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代表者】 古森 重▲隆▼

【代理人】

【識別番号】 100085109

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 政浩

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000402

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9801175

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 乾式分析素子及びその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水不透過性の透明支持体上に 1 層以上の水浸透性層が積層されており、さらにその上に、ポリエステルよりなり液体を均一に展開する機能を有する展開層を積層した乾式分析素子において、該ポリエステル展開層を構成している繊維の表面が有機溶剤で被覆されていることを特徴とする乾式分析素子

【請求項 2】 水不透過性の透明支持体上に 1 層以上の水浸透性層が積層されており、さらにその上に、ポリエステルよりなり液体を均一に展開する機能を有する展開層を積層した積層体の該展開層に有機溶剤を供給し、その後試薬溶液を供給することを特徴とする乾式分析素子の製造方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、液体試料中に存在する物質を分析する乾式分析素子及びその製造方法に関するものである。

【0002】

乾式分析素子は、いわゆる迅速かつ精度の高い検査結果が要求される臨床検査における生体試料、例えば血液、髄液、尿、便抽出液等の中に含まれるアナライトの定量において特に有用である。

【0003】

【従来技術】

最近、少量の液体試料を正確に定量分析しうる手段として一体型の多層よりなる乾式分析素子が開発され、その改善あるいは多様化を進めるべく種々の研究が行われている。この乾式分析素子は分析に必要な全ての試薬が予め組み込まれており、液体試料を点着して生じた発色を測定するだけで定量分析することができる。

【0004】

乾式分析素子の基本層構成は、水不透過性透明支持体の上に水浸透性層及び多

孔性展開層がこの順に積層されてなっている。

【0005】

多孔性展開層は、水性の検体に含有されている成分を実質的に偏在させることなしに平面的に拡げ、単位面積当りほぼ一定量の割合で水浸透性層に供給する機能を有する層であり、これまで種々の展開層が乾式分析素子用に開発されている。具体的には特開昭49-53888に開示されているメンブランフィルター（ブラッシュドポリマー）に代表される非繊維性等方的微多孔質媒体層、特開昭55-90859等を開示されたポリマーミクロビーズが水不膨潤性の接着剤で点接触状に接着されて成る連続空隙含有三次元格子粒状構造物層に代表される非繊維性多孔性層、特開昭55-164356、同57-66359等を開示された織物布地からなる多孔性層、同60-222769等を開示された編物布地からなる層等を挙げることができる。

【0006】

例えば、セルロース誘導体（DAC，TAC，NC，HMC（ヒドロキシメチルセルロース），HEC（ヒドロキシエチルセルロース））の多孔質膜、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、塩化ビニール等のエチレン重合体または共重合体で作られた多孔質膜、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリスルホン等で作られた多孔質膜、アクリル酸やメタクリル酸、これらのエステルビニル重合体または共重合体から成る多孔質膜、ナイロン、ポリアミド、ポリウレタン等の縮合重合体の多孔膜、ガラス粒子、けい藻土等の無機材料微粒子を少量のポリマーで結合させて作られた多孔性膜、ポリテトラフルオロエチレンで作られた多孔性膜、濾紙、ガラス繊維濾紙等がある。

【0007】

上記の各種の多孔性展開層はそれぞれ一長一短があって、各種のものが使用されているが、そのひとつにポリエステル布がある。ところが、ポリエステルは疎水性であるためそのままでは使用できず、検体の展開促進のため界面活性剤や親水性ポリマーなどを含有させている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

ところが、このポリエステル布を用いた乾式分析素子は試薬の発色ムラを時折生じることがあった。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するべく鋭意検討の結果、乾式分析素子の製造工程において、ポリエステル布に親水性ポリマーや試薬を塗布すると液の不均一なしみこみを生じてこれらが均一に含有されていないことを見出した。

【0010】

そこで、ポリエステル布を時前に親水化する手段を種々検討の結果、支持体に水浸透性層及びポリエステル布の展開層を積層した積層体の展開層に試薬溶液を塗布する前に有機溶剤を塗布して親水化しておくことによって、上記の課題を解決しうることを見出した。

【0011】

すなわち、本発明は、

水不透過性の透明支持体上に1層以上の水浸透性層が積層されており、さらにその上に、ポリエステルよりなり液体を均一に展開する機能を有する展開層を積層した乾式分析素子において、該ポリエステル展開層を構成している繊維の表面が有機溶剤で被覆されていることを特徴とする乾式分析素子と、

水不透過性の透明支持体上に1層以上の水浸透性層が積層されており、さらにその上に、ポリエステルよりなり液体を均一に展開する機能を有する展開層を積層した積層体の該展開層に有機溶剤を供給し、その後試薬溶液を供給することを特徴とする乾式分析素子の製造方法に関するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の分析素子の基本構成は、水不透過性透明支持体の上に、水浸透性層および多孔性展開層が、この順に積層されてなる。

【0013】

本発明では、この積層体の多孔性展開層にポリエステル布を用い、試薬溶液を

供給する前に有機溶剤を供給するところに特徴がある。

【0014】

ポリエステルはポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート等であり、ポリエステル布は編物、織物のいずれであってもよい。

【0015】

ポリエステルの厚みは50～1000 μ m程度、好ましくは100～500 μ m程度である。

【0016】

展開層は、1層だけに限定する必要はなく、特開昭61-4959、同62-138756、同62-135757、同62-138758等の開示されている様に、2層以上の層を重ねて用いることができる。

【0017】

展開層中には、検体の展開を促進するために、ノニオン、アニオン、カチオンもしくは両性の界面活性剤を含ませることができる。

【0018】

また、展開性をコントロールする目的で、親水性のポリマー等の展開制御剤を含ませることができる。

【0019】

更に、目的とする検出反応を促進する為の、あるいは干渉、妨害反応を低減、阻止する為の各種試薬、もしくは試薬の1部を含ませることができる。

【0020】

展開層の厚さは、50～1000 μ m、好ましくは100～500 μ m、更に好ましくは200～400 μ mである。

【0021】

水浸透性層の代表的な層である親水性ポリマー層は、通常分析に必要な試薬の少なくとも1部を含んでおり、その場合、この層は試薬層と称される。この層にはこれまで乾式分析素子に使われている公知の水に可溶性、膨潤性、親水性の各種ポリマーを用いることができる。水吸収時の膨潤率が30℃で約150%から約2000%、好ましくは約250%から約1500%の範囲の天然又は合成親

水性ポリマーを使用することができ、具体的には、特開昭59-171864、同60-108753等の開示されたゼラチン（例えば、酸処理ゼラチン、脱イオンゼラチン等）、ゼラチン誘導体（例えば、フタル化ゼラチン、ヒドロキシアクリレートグラフトゼラチン等）、アガロース、プルラン、プルラン誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0022】

親水性ポリマー層に代えて、ポリマー多孔質膜等を用いることもできる。

【0023】

親水性ポリマー層の厚さは、乾燥時に約 $1\mu\text{m}$ ～約 $100\mu\text{m}$ 、好ましくは約 $3\mu\text{m}$ ～約 $50\mu\text{m}$ 、特に好ましくは約 $5\mu\text{m}$ ～約 $30\mu\text{m}$ であり、実質的に透明であることが好ましい。

【0024】

親水性ポリマー層中には、目的とする反応を促進する、もしくは干渉、妨害反応を防止、低減するための各種試薬もしくは試薬の1部を含ませることができる。

【0025】

水不透過性透明支持体としては、これまで乾式分析素子に使われている公知の水不透過性の透明支持体を用いることができる。具体的には、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、セルロースエステル（例えば、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートプロピオネート等）等から成る厚さ約 $50\mu\text{m}$ ～ 1mm 、好ましくは約 $80\mu\text{m}$ ～約 $300\mu\text{m}$ の透明フィルムを用いることができる。

【0026】

支持体の表面には、必要により公知の下塗層もしくは接着層を設けて、親水性ポリマー層との接着を強固にすることができる。

【0027】

乾式分析素子には、分析項目等に応じてさらに各種の層が組込まれる。例えば検出層、吸水層、光反射層、光遮蔽層等である。

【0028】

本発明においては、この積層体の最上層であるポリエステル布の展開層に試薬を供給する前に有機溶剤を供給するところに特徴がある。

【0029】

このポリエステル布に供給して親水化する有機溶剤は親水性と親油性を併有するものであり、両極性である。具体的には、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール等の炭素数が1～4の低級アルコール、アセトン、メチルエチルケトン等のケトンが好ましく、エタノールとアセトンが最も好ましい。

【0030】

有機溶剤の供給量はポリエステル布の体積（空隙を含む。）の30～90％程度、好ましくは50～70％程度が適当である。供給方法は要はポリエステル布面に均一に供給できればよく、通常は塗布によって行う。塗布方法も問わないがスプレー塗布が簡便である。

【0031】

塗布後放置は特に行わなくてもよい。塗布後の乾燥は25℃～60℃で1分～30分程度行えばよい。

【0032】

有機溶剤の被覆は、一般的にはGC（ガスクロマトグラフィー）により行うことができ、有機溶剤の残存量は0.1～5％程度である。

【0033】

有機溶剤を供給してポリエステル繊維の表面を有機溶剤で被覆後、この展開層に試薬溶液を供給する。この試薬溶液は対象とする被検物質により定まるが、通常は水溶液、又はエタノール、アセトンなどの有機溶剤溶液である。

【0034】

本発明においては、対象とする被検物質は特に限定されない。通常臨床検査の分野で測定される酵素、脂質、無機イオン、代謝産物、蛋白質等の他、各種グロブリン、免疫抗原、免疫抗体等の生体由来成分、薬物、ホルモン、腫瘍マーカー

、DNA、RNA等、分析方法さえ確立していれば、分析対象とすることができる。

【0035】

本発明の乾式分析素子は分析に必要な全ての試薬を含んでいるが、この試薬は比色用指示薬を除いて公知の乾式分析素子と同じでよい。分析に必要な全ての試薬とは、必要不可欠な試薬であり、その他の試薬は適宜追加あるいは削除される。

【0036】

比色用指示薬とは、定量可能な比色変化を直接または間接的に生じ、その変化の割合を定量的に測定しうる着色または無色の物質である色原体および呈色性基質を含む。色原体は色素、色素形成剤、または色素前駆物質であってよい。本発明で使用されるものは水溶性のもので、溶解度が0.1%以上、通常0.5%以上のものである。具体例としては、ジクロロベンゼンジアゾニウム、ベンゼンスルホン酸ジアゾニウム等のジアゾニウム塩、アルフッソン、アソメチンアソメチンH等の比色試薬、WST-1、WST-3等の還元系発色試薬、p-ニトロフェニル誘導体、アミノアニリン誘導体、3-インドール誘導体、p-ニトロアニリン誘導体、チオ-NADH等の発色基質、メチルバイオレット6B、m-クレゾールパープル、コンゴレッド、メチルオレンジ、テトラブロムフェノールブルー、アリザリンスルホン酸ナトリウム、リトマス、ブロムフェノールレッド、チモールブルー、ナイルブルー、p-ニトロフェノール等のpH指示薬、アニジンブルー、アルセナゾーIII、バソクプロインスルホン酸ナトリウム、バソフェナントロリンスルホン酸ナトリウム、エリオクロムブラックT、カルシクローム、カルマガイト、カルボキシアルセナゾ、クロロホスホナーゾーIII、クロマズロールB、クロマズロールS、ジメチルスルホナゾーIII、ジニトロスルホナゾーIII、メチルチモールブルー、メチルキシレノールブルー、ネオトリン、スルホナゾーIII、Xylidyl Blue-I、Xylidyl Blue-II、Nitoro-PAPS、Phthalein Complexone、PDTS、Pyrocatechol Violet、Zylenol Orange等の金属指示薬、DAB、HPPA、TMBZ・HCl、DA-67、DA-6

4、ABTS、MCDP、BCMA、LLGB等の酸化系発色試薬、4-アミノアンチピリン等のカップラー、ADPS、ALPS、DAPS、HADAPS、MAPS、TOPS、ADOS、ALOS、DAOS、HDAOS、MAOS、TOOS、HALPS等のトラインダー試薬等がある。

【0037】

展開層のポリエステル布に界面活性剤や親水性ポリマーを供給する場合には前記の有機溶剤被覆を行った後、試薬溶液を供給する前が好ましい。

【0038】

【実施例】

[実施例1]

ゼラチン下塗りされている $180\mu\text{m}$ のポリエチレンテレフタレート無色透明平滑フィルムに下記組成の水溶液を、乾燥後の厚さが $14\mu\text{m}$ になるように塗布し乾燥した。

ゼラチン	14.1 g/m^2
ペルオキシダーゼ	12.0 KU/m^2
グルコースオキシダーゼ	6.0 KU/m^2
グルコアミラーゼ	5.0 KU/m^2
ロイコ色素	0.5 g/m^2
界面活性剤	1.0 g/m^2

【0039】

ここで、界面活性剤は、ポリオキシ(2-ヒドロキシ)プロピレンノニルフェニルエーテル(Surfactant 10G, オーリン社製)を、ロイコ色素は、2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4-(4-ジメチルアミノフェニル)-5-フェネチルイミダゾール酢酸塩を用いた。

【0040】

次に上記フィルム上に下記組成の水溶液を乾燥後の厚さが $10\mu\text{m}$ になるように塗布し、乾燥した。

ゼラチン	10.2 g/m^2
界面活性剤	0.5 g/m^2

【0041】

次に上記フィルム上に下記組成の $pH = 6.4$ に調整された水溶液を乾燥後の厚さが $8 \mu m$ になるように塗布し、乾燥した。

ヒドロキシプロピルセルロース	$4.7 g/m^2$
カルボキシメチルスターチ	$3.5 g/m^2$
PIPES	$0.9 g/m^2$
マンニトール	$2.3 g/m^2$
界面活性剤	$1.2 g/m^2$

【0042】

次に、上記フィルム上に約 $60 g/m^2$ の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編み物布地を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させた。

【0043】

上記布地上に、エタノールを $200 g/m^2$ となるように塗布し (=OC1塗布)、乾燥後下記組成のエタノール溶液を各々の成分が下記の量となるように、そして乾燥後の厚さが $5 \mu m$ になるように、塗布し (=OC2塗布)、乾燥させ、一体型多層分析要素を作製した。

アミラーゼ標識抗C反応性蛋白マウス抗体	$14.0 KU/m^2$
抗C反応性蛋白マウス第二抗体	$6.2 mg/m^2$
ポリビニルピロリドン	$5.6 g/m^2$
界面活性剤	$0.2 g/m^2$

【0044】

上記の一体型多層分析要素を $12 mm \times 13 mm$ 四方のチップに切断し、スライド枠 (特開昭57-63452号公報に記載) に納めて、本発明に従うCRP分析用乾式スライド(1)を作製した。

【0045】

[実施例2]

OC1塗布としてアセトン $200 g/m^2$ 塗布し、乾燥させる以外は、実施例1と同様にして、CRP分析用乾式スライド(2)を作製した。

【 0 0 4 6 】

〔実施例 3〕

OC1 塗布としてメタノールを 200 g/m^2 塗布し、乾燥させる以外は、実施例 1 と同様にして、CRP 分析用乾式スライド(3)を作製した。

【 0 0 4 7 】

〔比較例 1〕

OC1 塗布を実施しないこと以外は、実施例 1 と同様にして、CRP 分析用乾式スライド(4)を作製した。

【 0 0 4 8 】

〔測定例 1〕

下記組成(*)の希釈液と免疫比濁法にて検定された CRP 濃度 1.4, 4.2, 10.0 mg/dL の人血清を希釈液にて 21 倍希釈した液を上記実施例 1 ~ 3 及び比較例 1 で作製したスライドに $10 \mu\text{L}$ 点着する。

【 0 0 4 9 】

その後、 37°C にて 5 分間インキュベートしながら、およそ 10 秒おきに 650 nm における反射濃度を富士ドライケム 5000 (富士写真フイルム (株) 製) により測定した。

そのときの 3 分 ~ 5 分の反射濃度より 2 分あたりの反射濃度 (ΔODr) をもとめた。

【 0 0 5 0 】

【表 1】

* 希 釈 液 組 成

MES * ¹	5mg
カゼイン水溶液 * ²	100mg
アジ化ナトリウム	0.2mg
精 製 水	1.0ml

* 1 MES : 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸モノハイドレート

* 2 例えば、商品名 : ブロックエース

【 0 0 5 1 】

【表 2】

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1
希 釈 液	0.428	0.407	0.424	0.353
CRP 1.4mg/dL	0.383	0.349	0.362	0.291
CRP 4.2mg/dL	0.317	0.287	0.299	0.236
CRP 10.0mg/dL	0.236	0.222	0.226	0.187
OD-レンジ	0.192	0.185	0.198	0.166

ODレンジ： ΔOD_r （希釈液）－ ΔOD_r （10mg/dL）

【0052】

上記結果よりあきらかなように、検量線の傾きの尺度となるODレンジは、比較例1に比べ、本実施例1～3の乾式分析要素では、大きく良好である。

【0053】

〔測定例2〕

測定例1と同じように、免疫比濁法にて検定されたCRP濃度4.2mg/dLの液を希釈液にて21倍希釈後、上記実施例1～3及び比較例1で作製したスライドにそれぞれ10枚ずつ点着し、富士ドライケム5000にて測定した。

【0054】

その後、測定例1と同様に3分～5分の反射濃度より2分あたりの反射濃度を求めた。

【0055】

その反射濃度を測定例1のCRP濃度と ΔOD_r より求めた3次式近似した検量線よりCRP濃度に換算し、 $n=10$ 測定での変動係数（CV%）を求めた。

【0056】

【表 3】

	実施例1	実施例2	実施例3	比較例1
1	4.1	4.3	4.4	4.0
2	4.3	4.2	4.3	3.9
3	4.2	4.1	4.0	3.9
4	4.1	4.1	4.5	3.9
5	4.2	4.2	4.2	3.9
6	4.3	4.4	4.1	3.3
7	4.4	4.1	4.3	3.8
8	4.5	4.0	4.2	3.9
9	4.1	4.5	4.2	5.0
10	4.4	4.4	4.4	4.7
平 均 値	4.3	4.2	4.3	4.0
SD(mg/dL)	0.14	0.16	0.15	0.48
C V (%)	3.4	3.9	3.5	11.9

【0057】

上記結果より明らかなように、比較例1に比べ、本発明の実施例1～3では測定バラツキの尺度となる変動係数（CV）が小さく良好である。

【0058】

【発明の効果】

本発明の有機溶剤被覆処理を行うことにより、試薬のポリエステル布下層への浸透を容易にし、さらに試薬を均一に含有させることができる。その結果、試薬の発色ムラを減少させてCV（変動係数）を改善できるばかりでなく、発色強度も高めることができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ポリエステル布展開層から塗布して含有させる試薬の濃度ムラや発色ムラのない乾式分析素子を提供する。

【解決手段】 上記課題は、水不透過性の透明支持体上に 1 層以上の水浸透性層が積層されており、さらにその上に、ポリエステルよりなり液体を均一に展開する機能を有する展開層を積層した乾式分析素子において、該ポリエステル展開層を構成している繊維の表面が有機溶剤で被覆されていることを特徴とする乾式分析素子によって解決される。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005201]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名	富士写真フイルム株式会社